

·临床信息学·

高内涵无荧光标记活细胞的运动追踪分析

李娟,张选红,关苑君,梁翠莎,吴珏珩

(中山大学中山医学院,广东 广州 510080)

摘要:细胞运动与多种细胞行为及疾病发生治疗等息息相关,通过实时细胞追踪和分析可为揭示细胞行为以及细胞运动的规律、以及疾病发生机制等提供实验依据。当前细胞追踪的常规实验方法多是从群体层面对细胞迁移进行间接分析,无法追踪迁移过程中单个细胞的形态学以及运动动力学等参数的变化,尤其对于无荧光标记活细胞,常规明场或相差图像的追踪分析,存在图像中背景与细胞间的对比度低、细胞边界不连续等问题,难以实现细胞形态的准确识别和分辨以及自动追踪分析。高内涵细胞成像系统设备结合了活细胞成像模块和多参数的高内涵分析软件,可实现无标记活细胞快速成像以及自动分割识别和追踪分析。本文总结了高内涵成像系统的无标记细胞分析模块在体外细胞运动追踪实验中的应用。

关键词:高内涵成像分析;无标记活细胞;细胞追踪

中图分类号:Q334

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2024.10.001

文章编号:1006-1959(2024)10-0001-05

Motion Tracking Analysis of High-content Non-fluorescent Labelling in Living Cells

LI Juan,ZHANG Xuan-hong,GUAN Yuan-jun,LIANG Cui-sha,WU Jue-heng

(Zhongshan School of Medicine,Sun Yat-sen University,Guangzhou 510080,Guangdong,China)

Abstract:Cell movement is closely related to a variety of cell behaviors and disease treatment. Real-time cell tracking and analysis can provide experimental basis for revealing cell behavior, cell movement rules, and disease mechanism. At present, the conventional experimental methods of cell tracking are mostly indirect analysis of cell migration from the group level, which cannot track the changes of parameters such as morphology and motion dynamics of single cells during migration. Especially for non-fluorescent labelling in living cells, the tracking analysis of conventional bright field or phase difference images has problems such as low contrast between the background and cells in the image and discontinuous cell boundaries. It is difficult to achieve accurate identification and resolution of cell morphology and automatic tracking analysis. The high-content imaging system equipment combines the live cell imaging module and multi-parameter high-content analysis software, which can realize fast imaging of unlabeled live cells and automatic segmentation, recognition and tracking analysis. This paper summarizes the application of the label-free cell analysis module of the high-content imaging system in in vitro cell movement tracking experiments.

Key words:High-content imaging analysis;Label-free living cells;Cell tracking

细胞运动(cell movement)是一种基本的细胞行为,是发育^[1,2]、组织维持^[3]、免疫^[4,5]和组织再生^[6,7],以及病理等多种生理过程的基础^[8-10]。因此,实现对细胞运动行为的实时监测和分析,有利于了解其作用机理,协助药物开发和疾病治疗。传统体外细胞运动检测方法包括划痕、Transwell 培养小室、趋化载玻片等实验。借助显微镜时间序列成像和软件分析,通过区分和跟踪细胞,提取位置和形态等信息^[11,12]。无荧光标记的活细胞追踪一般采用相差(phase contrast)成像模式,能更清晰地显示细胞形态。然而,相差图像因细胞与背景对比度低,目前的

分析软件难以实现细胞的准确识别和分割^[13]。因此,许多相关细胞追踪实验仍依赖于手动跟踪。高内涵成像系统(high content imaging system)结合显微成像及多参数定量图像分析技术,可实现单细胞水平上的客观多参数采集和数据分析。在细胞活性、细胞周期、毒性检测等方面应用广泛^[14-16],其数字相差成像(digital phase contrast, DPC)模块通过明场图像构建数字相差图像,显著改善信噪比,实现无荧光标记细胞的自动准确识别和追踪,可分析得到实时追踪的细胞数、面积以及荧光信号强度变化、纹理参数、细胞动力学特征等多种数据结果,降低了实验复杂性和成本。本文将介绍高内涵成像系统的数字相差成像模块在无荧光标记细胞的运动追踪分析中的应用,旨在为细胞迁移等相关研究提供一种高效的实验方法与技术手段。

1 无荧光标记细胞追踪常用实验方法存在的问题

目前划痕、Transwell 培养小室、趋化载玻片等

作者简介:李娟(1983.10-),女,湖北孝感人,硕士,实验师,主要从事显微成像设备共享管理研究

通讯作者:吴珏珩(1972.3-),女,广东广州人,博士,正高级实验师,主要从事实验室建设与管理研究

实验方法应用广泛,但在成像通量、数据客观性,实时精确追踪,自动定量分析等方面存在不足。

1.1 实验可重复性较差、采样率低 划痕实验成本低,操作简单。但很难保证划痕的大小和宽度一致,影响实验结果的可重复性和一致性。另外,划痕还可能会影响划痕边界周围细胞的活性和运动潜能,脱落的部分细胞可能会造成划痕愈合的假象。其次,常规活细胞成像系统受限于相机成像速度,即使具备大图拼接成像功能,也较难同时采集所有划痕区域的图像,一般会挑选较好的局部区域成像和追踪,存在人为偏差。此外,超过 24 h 的监测不能排除细胞增殖对划痕愈合的影响。

1.2 无法考量运动速度 Transwell 实验是检测悬浮细胞运动能力的经典方法,对于细胞的运动和迁移能力的评价主要依赖于对转移至底膜外侧细胞的甲紫染色和计数。该方法只适用于终点检测,难以实时检测细胞的运动变化。无法考察细胞的运动速度。

1.3 无法自动识别分析 常规明场或相差图像存在图像中背景与细胞间的对比度低、细胞边界不连续、以及环细胞伪影等问题,难以实现细胞自动分割识别和追踪分析。活细胞追踪通常采用荧光染色或荧光标记法,过程繁琐,且存在荧光通道串色,以及荧光成像时的光毒性等问题。

1.4 手动分析流程复杂、单细胞检测通量低 划痕实验手动分析一般只能从群体层面上对细胞迁移进行间接融合度分析,无法观察和分析每个细胞在迁移中的速度、轨迹,以及形态变化等;无法追踪细胞是否增殖、细胞增殖对划痕愈合的影响,以及划痕前缘的细胞与其他细胞在迁移过程中的区别等等问题。手动单个细胞追踪分析流程复杂,通量低,工作量大、耗时且存在误差。

2 高内涵细胞运动追踪实验成像方法

不同于细胞染色方法,基于图像方式的细胞运动分析方式是近年来发展起来的技术,该方法无需染色,通过软件算法对无标记活细胞的时间序列图像精细分割,分离圈选细胞,对细胞进行定位,实现细胞实时追踪^[7]。高内涵细胞成像系统设备结合了活细胞工作站、硬件转盘式共聚焦成像模块和多参数的高内涵分析软件,可实现无标记活细胞快速成像以及基于图像方式的自动分割分析^[8],在无标记活细胞追踪实验中应用广泛。其保留了活细胞工作站的优点,同时实现了高通量的实时检测,对单个细

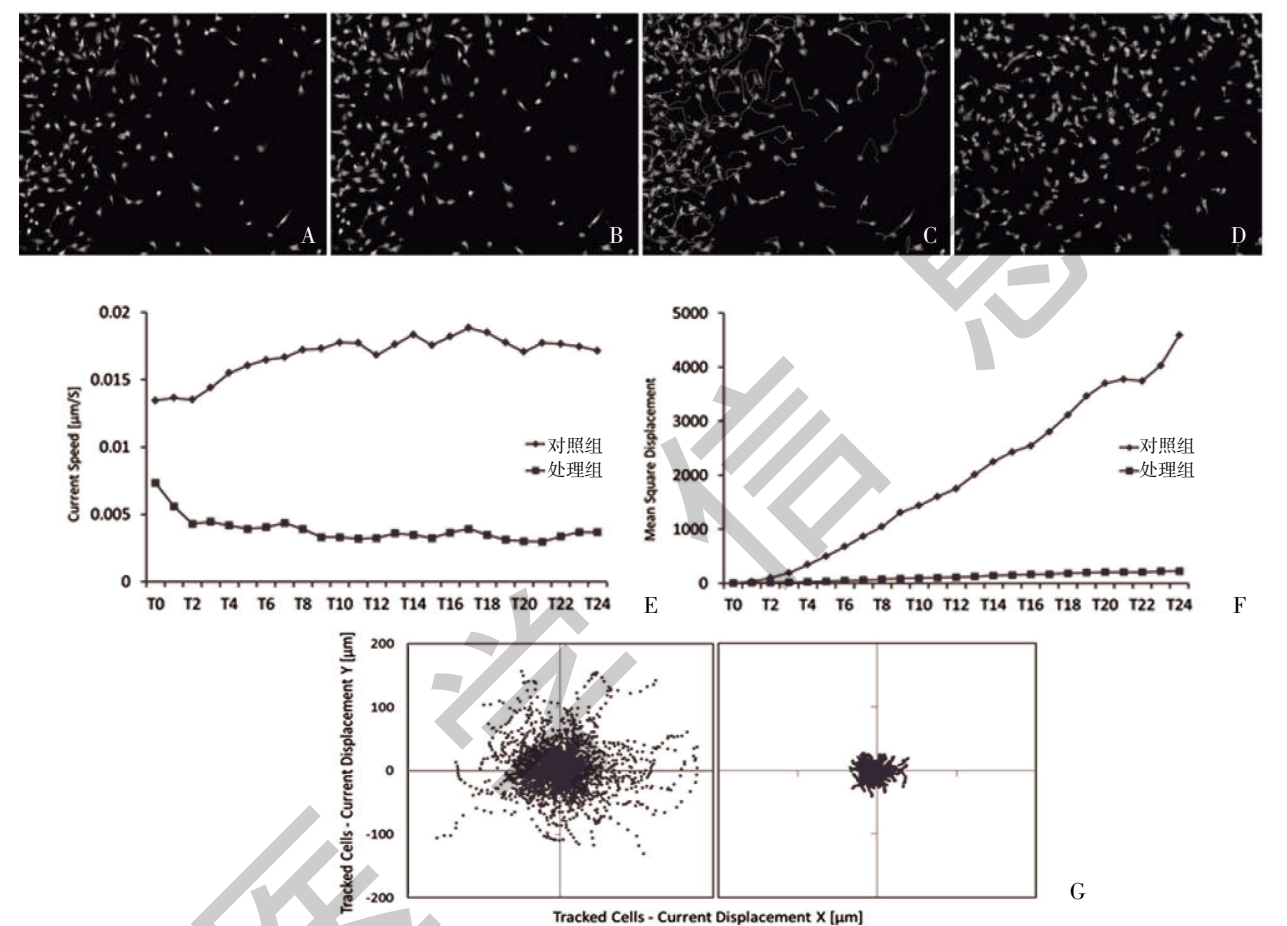
胞和细胞群落的运动均可进行分析,借助于多重分析模块,可对细胞运动时形态与微结构的变化实时追踪观察,在活细胞状态下对细胞运动的相关信息进行直观而详尽的分析。

2.1 高内涵无标记活细胞趋化实验分析 以趋化因子分析为例,使用搭载活细胞控件的高内涵成像分析系统(PE Operetta CLS)监测了 500 nmol/L 细胞松弛素 D 对 HT-1080 纤维肉瘤细胞迁移的影响。加入化合物后,微孔板放入预热的 Operetta 系统上,孵育 30 min。使用 10×物镜采集数字相衬图像(图 1A),细胞识别(图 1B)。成像时间间隔 6 min,总检测和成像时长 2.5 h。使用配套的 Harmony 软件的追踪模块进行细胞的动力学特性和轨迹特性分析。对照组和处理组分别通过软件圈选细胞和自动追踪运动轨迹(图 1C、图 1D),对当前速度、均方位移,根据每孔细胞的平均值作图(图 1E、图 F),并根据当前位置坐标追踪单个细胞的实时轨迹(图 1G)。通过对细胞进行圈选分割和追踪分析,可计算时间相关的动力学特性变化数据如当前速度、当前位置坐标等。除了每个时间点的参数,还可以计算整个追踪轨迹的参数,如平均累计距离(accumulated distance)、平均位移(displacement)和平均速度(average speed)(表 1)。分析数据显示,细胞松弛素 D 明显影响细胞的运动迁移能力。

2.2 高内涵自动追踪分析和常规手动分析的比较 对于无标记活细胞,常规明场或相差图像难以实现细胞自动识别和追踪分析,常使用手动追踪方法分析,如结合使用 Image J 图像处理软件和 ibidi 公司的用于分析趋化或迁移数据的免费软件 ibidi chemotaxis and migration tool 进行手动追踪。为比较高内涵活细胞追踪分析和常规手动分析,同样使用 500 nmol/L 细胞松弛素 D 处理 HT-1080 纤维肉瘤细胞。导入采集的时间序列图像到 Image J 软件中,通过手动模式记录细胞轨迹:选择 1 个细胞,点击细胞中心点,会显示初始位置坐标,之后手动点击选取每张时间序列图像中的细胞中心点,会产生该细胞随时间变化的坐标信息。按同样的流程,两组均统计 50 个细胞的轨迹,保存轨迹坐标值表格。再将数据导入 ibidi chemotaxis and migration tool 中进行数据统计分析和画图。分析可得到两组细胞追踪轨迹的平均累计距离、平均位移和平均速度(表 2),以及两组追踪的细胞在每个时间点的位置坐标参数,并根

据每个细胞的实时位置坐标绘制追踪轨迹图。

手动追踪分析方法也可得到每条轨迹的累计距离、平均位移和速度参数,但无法直观获得每孔所有细胞群体和时间相关的动力学特性变化如当前速度等参数,以绘制速度随时间变化的曲线。也不能得到评价趋化运动的均方位移的定量数据,只能通过追踪的累计距离图定性比较(图 2)。更无法获得每个时间点的单个细胞的面积、圆度等形态学特性变化,细胞的荧光强度变化等信息。虽然两种分析方法得到的数据数量级相当,但相对于自动追踪分析,手动追踪存在分析通量低、工作量大以及手动点选细胞中心点造成的误差等问题。



A. DPC 数字相衬成像(10×);B.细胞识别; C.对照组运动轨迹,D.500 nmol/L Cytochalasin D 处理组运动轨迹;E:当前速度;F:均方位移;G:单细胞实时轨迹

图 1 HT-1080 纤维肉瘤细胞高内涵成像和细胞追踪分析

表 1 细胞运动的追踪轨迹的参数			表 2 手动追踪分析结果		
追踪参数	对照组	处理组	追踪参数	对照组	处理组
追踪轨迹数	486	435	追踪轨迹数	50	50
每条轨迹的平均累计距离	133.09 μm	31.62 μm	每条轨迹的平均累计距离	178.088 μm	51.21 μm
	Std Dev 53.45	Std Dev 9.6		Std Dev57.324	Std Dev19.64
每条轨迹的平均位移	76.55 μm	14.69 μm	每条轨迹的平均位移	95.64 μm	16.26 μm
	Std Dev 48.39	Std Dev 9.07		Std Dev 58.32	Std Dev 10.32
每条轨迹的平均速度	0.0154 μm/s	0.0037 μm/s	每条轨迹的平均速度	0.02 μm/s	0.006 μm/s
	Std Dev 0.0062	Std Dev 0.001			

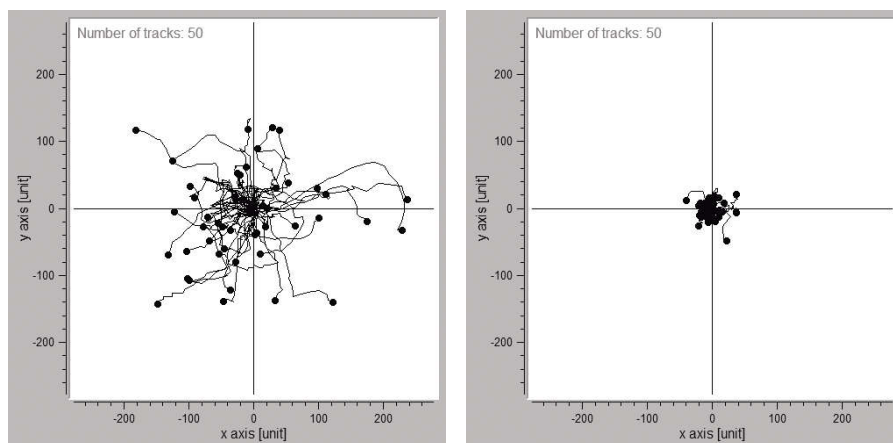


图 2 对照组和处理组追踪细胞的累计距离图

3 高内涵无标记活细胞追踪方法的优势

相对于传统细胞运动检测方法,高内涵成像系统可实时无标记的单细胞以及细胞群体的高速低毒性成像。自动追踪分析功能在分析便捷度、分析通量、数据精准度以及参数种类方面都具有明显的优势。

3.1 成像速度快,光毒性小 采用转盘式多点同步扫描方式,采集速度快,降低了对样品的光漂白和光损伤。数字相位成像使用红光 LED 透射光源,光毒性低。可快速实现整孔或整板成像,采样量大,所有样品的成像分析条件完全相同,可很好地消除人为偏差,定量统计结果更客观。

3.2 高信噪比数字相差成像 数字相差景深包围成像,使用在不同 Z 平面采集的两幅明场图像构建数字相位图像。重建基于数学算法,该算法考虑了试样折射率变化引起的光强分布变化率。生成的数字相位图像与具有高信噪比的荧光标记细胞的形态图像性质相当,适合单个细胞图像分割。且已有相关实验证明,数字相衬图像上的单细胞检测是可靠的,与基于荧光图像的分割进行比较时,显示出相似的结果。

3.3 自动图像分割分析 细胞分割(cell segmentation)是生物图像分析中很重要的一步。也是细胞追踪的第一步,分割结果的好坏直接决定了细胞追踪的准确度。在控制细胞密度的前提下,无需“划痕”处理,结合搭载的图像分析软件,高内涵成像系统可实现图像自动分割识别。即可对细胞的运动学和分裂代次等参数进行分析,对感兴趣的细胞群进行移动距离、速度、分裂、方向位移、分裂代次等多参数分析,从而对比不同处理组细胞的变化情况。

4 讨论

明场图像由于背景的整体强度与细胞的强度大

致相同,对于高度融合的单层、非常薄的样品或超薄的细胞区域,明场图像信噪比低,使得结构难以可视化^[19]。虽然通过对明场图像进行简单的欠焦可以提高图像对比度,然而使用这种方法的形态学细节,尤其是细胞的较薄区域的形态学信息,可能会丢失。此外通过欠焦提高对比度的明场图像用于单细胞分割效果仍然不佳。

高内涵数字相差图像采用基于明场图像的计算方法来生成,算法根据两个明场图像之间光强分布的变化率,显著提高信噪比,实现类似荧光图像的分割和圈选效果^[20]。取代细胞质染色进行细胞分割,为其他感兴趣的标记释放一个荧光通道。降低了实验复杂性和成本。自动模块化的分析可直观快捷得到多种细胞水平参数,如数量、面积、圆度、形态变化、信号强度以及纹理参数、细胞动力学特征等。此外,因为明场图像采集使用光毒性低的红色 LED 光源,结合纹理识别和机器自学习等功能,除了运动追踪分析,还适用于细胞增殖^[21]、细胞表型分类^[22]、化合物对细胞的毒性检测^[23,24]、菌落生长和分化^[25]、肿瘤类器官药物反应^[26]、辐射诱导的细胞损伤表型分析^[27]、斑马鱼胚胎发育^[28]等多种检测和应用。

虽然高内涵成像分析系统在无标记活细胞成像分析中应用广泛,且具有居多优点。但在样品准备和耗材选择等方面需注意,对于活细胞运动追踪,种板密度非常重要,细胞密度较高时,细胞黏连或成团,将影响自动分割识别的准确度。其次,自动高通量成像对于微孔板质量要求较高,孔板底部厚度不均易导致部分视野失焦,DPC 数字相差成像效果不佳,影响后续细胞的分割圈选识别准确度。另外,由于 DPC 图像是基于明场图像构建,曝光设置应针对相

机动态范围内的亮场强度合理设置,明场图像的过度曝光以及光强不足将导致全黑图像或非常暗的DPC图像。此外,由于光学现象,使用5×物镜生成的DPC图像的质量(对比度)与耗材类型相关。一般来说,384孔板的对比度较好,96孔板次之,而载玻片上的细胞对比度最差。除耗材影响,对于需低倍整孔成像的实验,可靠的数字相差图像重建,需注意图像不能包含任何微孔板孔边界。相位重建算法不补偿边界效应。

参考文献:

- [1]Yamada KM,Sixt M.Mechanisms of 3D cell migration[J].Nat Rev Mol Cell Biol,2019,20(12):738–752.
- [2]Schumacher L.Collective Cell Migration in Development[J].Adv Exp Med Biol,2019,1146:105–116.
- [3]SenGupta S,Parent CA,Bear JE.The principles of directed cell migration[J].Nat Rev Mol Cell Biol,2021,22(8):529–547.
- [4]Worbs T,Hammerschmidt SI,Förster R.Dendritic cell migration in health and disease[J].Nat Rev Immunol,2017,17(1):30–48.
- [5]Liu J,Zhang X,Cheng Y,et al.Dendritic cell migration in inflammation and immunity [J].Cell Mol Immunol,2021,18(11):2461–2471.
- [6]Torres P,Castro M,Reyes M,et al.Histatins,wound healing,and cell migration[J].Oral Dis,2018,24(7):1150–1160.
- [7]Fu X,Liu G,Halim A,et al.Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair[J].Cells,2019,8(8):784.
- [8]Paul CD,Mistriotis P,Konstantopoulos K.Cancer cell motility: lessons from migration in confined spaces [J].Nat Rev Cancer,2017,17(2):131–140.
- [9]Kohli K,Pillarisetty VG,Kim TS.Key chemokines direct migration of immune cells in solid tumors [J].Cancer Gene Ther,2022,29(1):10–21.
- [10]Perrin J,Capitao M,Mougin-Degraef M,et al.Cell Tracking in Cancer Immunotherapy[J].Front Med (Lausanne),2020,7:34.
- [11]Piltti KM,Cummings BJ,Carta K,et al.Live-cell time-lapse imaging and single-cell tracking of in vitro cultured neural stem cells – Tools for analyzing dynamics of cell cycle, migration, and lineage selection[J].Methods,2018,133:81–90.
- [12]Gómez-Villafuertes R,Paniagua-Herranz L,Gascon S,et al. Live Imaging Followed by Single Cell Tracking to Monitor Cell Biology and the Lineage Progression of Multiple Neural Populations[J].J Vis Exp,2017(130):56291.
- [13]Jaccard N,Szita N,Griffin LD.Segmentation of phase contrast microscopy images based on multi-scale local Basic Image Features histograms [J].Comput Methods Biomech Biomed Eng Imaging Vis,2017,5(5):359–367.
- [14]Circu ML,Dykes SS,Carroll J,et al.A Novel High Content Imaging –Based Screen Identifies the Anti –Helminthic Niclosamide as an Inhibitor of Lysosome Anterograde Trafficking and Prostate Cancer Cell Invasion [J].PLoS One,2016,11(1):e0146931.
- [15]Booij TH,Price LS,Danen EHJ.3D Cell –Based Assays for Drug Screens: Challenges in Imaging, Image Analysis, and High-Content Analysis[J].SLAS Discov,2019,24(6):615–627.
- [16]Li S,Xia M.Review of high-content screening applications in toxicology[J].Arch Toxicol,2019,93(12):3387–3396.
- [17]Boukari F,Makrogiannis S.Automated Cell Tracking Using Motion Prediction –Based Matching and Event Handling [J].IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform,2020,17(3):959–971.
- [18]Selinummi J,Ruusuvuori P,Podolsky,et al.Bright field microscopy as an alternative to whole cell fluorescence in automated analysis of macrophage images[J].PLoS One,2009,4(10):e749.
- [19]Tsai HF,Joanna G,Tyler FWS,et al.Usiigaci:Instance-aware cell tracking in stain-free phase contrast microscopy enabled by machine learning[J].Software,2019,9:230–237.
- [20]Ali R,Gooding M,Christlieb M,et al.Advanced phase-based segmentation of multiple cells from brightfield microscopy images[C]//IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: from Nano to Macro.IEEE,2008.
- [21]Fan M,Ma X,Wang F,et al.MicroRNA-30b-5p functions as a metastasis suppressor in colorectal cancer by targeting Rap1b [J].Cancer Lett,2020,477:144–156.
- [22]Adiga U,Taylor D,Bell B,et al.Automated analysis and classification of infected macrophages using bright-field amplitude contrast data[J].J Biomol Screen,2012,17(3):401–408.
- [23]Marescotti D,Gonzalez Suarez I,Acali S,et al.High Content Screening Analysis to Evaluate the Toxicological Effects of Harmful and Potentially Harmful Constituents (HPHC)[J].J Vis Exp,2016(111):53987.
- [24]Cross-Zamirski JO,Mouchet E,Williams G,et al.Label-free prediction of cell painting from brightfield images [J].Sci Rep,2022,12(1):10001
- [25]O'Duibhir E,Paris J,Lawson H,et al.Machine Learning Enables Live Label-Free Phenotypic Screening in Three Dimensions[J].Assay Drug Dev Technol,2018,16(1):51–63.
- [26]Spiller ER,Ung N,Kim S,et al.Imaging –Based Machine Learning Analysis of Patient –Derived Tumor Organoid Drug Response[J].Front Oncol,2021,11:771173.
- [27]Wen KK,Roy S,Grumbach IM,et al.A “Failed” Assay Development for the Discovery of Rescuing Small Molecules from the Radiation Damage[J].SLAS Discov,2021,26(10):1315–1325.
- [28]Lin S,Zhao Y,Xia T,et al.High content screening in zebrafish speeds up hazard ranking of transition metal oxide nanoparticles[J].ACS Nano,2011,5(9):7284–7295.

收稿日期:2023-05-23;修回日期:2023-07-03

编辑/肖婷婷